

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle**
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
2 octobre 2003 (02.10.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/080864 A1

(51) Classification internationale des brevets² : C12Q 1/68,
A61K 31/7088, 31/00, A61P 25/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/00940

(22) Date de dépôt international : 25 mars 2003 (25.03.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/03792 26 mars 2002 (26.03.2002) FR
60/372,116 15 avril 2002 (15.04.2002) US

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : EX-HONIT THERAPEUTICS SA [FR/FR]; 26, rue Brunel, F-75017 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : SCHWEIGHOFFER, Fabien [FR/FR]; 38 avenue Paul Déroulède, F-94300 Vincennes (FR). RESINK, Annelies [NL/FR]; 48, rue Bobillot, F-75013 Paris (FR).

(74) Mandataire : BECKER, Philippe; Becker et Associés, 35, rue des Mathurins, F-75008 PARIS (FR).



(81) États désignés (national) : AH, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, RU, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Titre: HISTONE DEACETYLASE: NOVEL MOLECULAR TARGET OF NEUROTOXICITY

(54) Titre : HISTONE DEACETYLASE: NOUVELLE CIBLE MOLECULAIRE DE LA NEUROTOXICITE

(57) Abstract: The invention concerns the field of biology, genetics and medicine. In particular, it concerns novel methods for detecting, characterizing and/or treating neurodegenerative pathologies, in particular amyotrophic lateral sclerosis. The invention also concerns methods for identifying or screening compounds active in said pathologies. The invention further concerns compounds, genes, cells, plasmids or compositions useful for implementing said methods. In particular, the invention concerns the role of histones deacetylases, and particularly histone deacetylase 2, in said pathologies and its use as therapeutic, diagnostic or experimental target.

(57) Abrégé : La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la détection, la caractérisation et/ou le traitement de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus. L'invention décrit notamment le rôle des histones déacétylases, et notamment l'histone déacétylase 2, dans ces pathologies et son utilisation comme cible thérapeutique, diagnostique ou expérimentale.

WO 03/080864 A1

HISTONE DEACETYLASE: NOUVELLE CIBLE MOLECULAIRE DE LA NEUROTOXICITE

La présente invention concerne le domaine de la biologie, de la génétique et de la médecine. Elle concerne notamment de nouvelles méthodes pour la 5 détection, la caractérisation et/ou le traitement de pathologies neurodégénératives, notamment de la sclérose latérale amyotrophique. L'invention concerne également des méthodes pour l'identification ou le screening de composés actifs dans ces pathologies. L'invention concerne également les composés, gènes, cellules, plasmides ou compositions utiles 10 pour la mise en œuvre des méthodes ci-dessus. L'invention découle notamment de l'identification du rôle des enzymes impliquées dans la phosphorylation de facteurs nucléaires, parmi lesquelles il convient de souligner les histones, dans ces pathologies et décrit leur utilisation comme cibles ou marqueurs thérapeutiques, diagnostiques ou expérimentaux de ces désordres.

15

De nombreuses pathologies neurodégénératives ont été décrites comme ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'excitotoxicité. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques et de la chorée de Huntington.

20

La sclérose amyotrophique latérale (SAL ou ALS pour Amyotrophic Lateral Sclerosis) est une maladie neurodégénérative associée à différents types d'inclusions tels les corps de Lewy et caractérisée par une apoptose des motoneurones spinaux et corticaux dont l'issue fatale est parfois associée à une 25 démence frontale. Des formes sporadiques, sans aucune mutation décrite, coexistent avec des formes familiales (FALS) associées à des mutations dans le gène SOD1 codant pour la superoxyde dismutase. La majorité des cas est sporadique, les formes familiales (FALS) étant très rares. Il est vraisemblable qu'une longue période asymptomatique précède l'apparition des symptômes 30 cliniques qui sont variés et dont la classification est complexe. Les futurs développements thérapeutiques substitueront aux traitements de la symptomatologie des stratégies basées sur les causes moléculaires de la

pathologie. Au niveau cellulaire, ces symptômes sont associés à une mort des motoneurones corticaux et des motoneurones spinaux. Cette mort neuronale a été reliée à différents phénomènes qui constituent la base de plusieurs pathologies neurodégénératives. C'est le cas de l'excitotoxicité liée au glutamate, du stress oxydatif, d'une certaine auto immunité dirigée contre des marqueurs neuronaux (les canaux calciques dans le cas de l'ALS) ainsi que d'anomalies du cytosquelette. Si ces phénomènes sont décrits, la ou les causes de ces maladies, dont l'ALS, sont obscures. Même si les FALS sont liées à des mutations dans le gène SOD1 qui code pour la superoxyde dismutase, les mécanismes qui engagent les neurones vers la mort cellulaire dont au moins une composante est l'apoptose, sont inconnus.

L'identification des événements moléculaires impliqués dans les différents phénomènes impliqués dans la mort cellulaire permettra de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'étude de ces événements est difficilement réalisable à partir de biopsies humaines. Ces biopsies proviennent évidemment d'échantillons post-mortem dont la qualité est difficilement contrôlable et ne représentent que des états pathologiques représentatifs des phases tardives de la maladie.

Les modèles animaux donnent accès à des échantillons biologiques qui permettent d'analyser différentes étapes du développement d'une pathologie et de comparer ces étapes à des témoins sains. A cet égard, des souris transgéniques qui expriment le gène humain SOD1 portant l'une des mutations qui prévaut dans les FALS (mutation G93A) sont disponibles auprès de Jackson Laboratory, sous condition de prise d'une licence d'utilisation auprès de la NorthWestern University. Ce modèle reproduit en 120 jours l'issue fatale de la maladie avec des symptômes comparables à ceux de la maladie humaine. L'apparition des symptômes d'ALS liés à la mutation G93A dans SOD1 n'est pas la conséquence d'une réduction de l'activité superoxyde dismutase mais d'un gain de fonction qui augmente la capacité de l'enzyme à générer des radicaux libres. Malgré ces informations, les événements moléculaires qui

président aux différentes étapes de l'ALS sont mal connus. La complexité de ces événements moléculaires reflète l'évolution de la pathologie : Dans le modèle transgénique étudié, aucune dérégulation neuronale ou manifestation clinique n'a été rapportée à 30 jours. 60 jours correspondent à un stade qui 5 précède de peu les premiers symptômes, mais qui est déjà caractérisé au niveau cérébral par des changements dans la physiologie cellulaire tels qu'une altération du métabolisme mitochondrial, un stress et une mort neuronale associés à un phénomène d'excitotoxicité. A 90 jours, 50% des motoneurones corticaux et spinaux sont morts et un processus actif d'apoptose neuronale est 10 engagé parallèlement à une activation astrocytaire. Le phénomène d'excitotoxicité n'est plus observé à ce stade. La mort neuronale y est associée à l'activation de caspases qui ne semblent pas impliquées dans les phases précoce de la pathologie.

A côté de ce modèle animal, il est également possible d'étudier le phénomène 15 d'excitotoxicité sur des modèles cellulaires. Les neurones granulaires du cervelet représentent un modèle avantageux pour l'étude de la mort neuronale expérimentale. En effet, les cultures de ces neurones présentent un enrichissement en neurones par rapport aux cellules gliales, ce qui permet d'étudier de façon préférentielle les événements propres à la mort neuronale.

20 Pour reproduire certains aspects de l'excitotoxicité, plusieurs approches sont envisageables. Les neurones peuvent être traités par du glutamate qui va stimuler l'ensemble des récepteurs à cet acide aminé excitateur, les récepteurs métabotropiques et les récepteurs ionotropiques. Des traitements à l'aide de NMDA ou de kainate peuvent également être appliqués de façon à stimuler 25 leurs récepteurs ionotropiques respectifs. L'une des conséquences de la stimulation de ces récepteurs ionotropiques est un efflux de potassium lors de l'ouverture de ces canaux. Cet efflux de potassium participe de façon directe au phénomène d'excitotoxicité puisque augmenter la concentration extracellulaire de potassium permet de réduire cette mort cellulaire.

30 Réciproquement, placer des cultures de neurones en présence de faibles concentrations de potassium conduit à leur mort.

Par conséquent placer des cultures de neurones en présence de faibles concentrations de potassium permet d'étudier l'une des composantes de l'excitotoxicité.

Identifier les différents événements moléculaires spécifiques de ce phénomène 5 doit permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques aussi bien que de nouveaux marqueurs diagnostiques.

La présente invention décrit à présent l'identification d'événements génétiques impliqués dans les phénomènes d'excitotoxicité et de mort neuronale. La 10 présente invention fournit ainsi de nouvelles approches thérapeutiques et diagnostiques des pathologies associées à ces phénomènes, ainsi que de nouvelles cibles pour l'identification de composés actifs.

Plus particulièrement, une analyse qualitative différentielle a été effectuée à 15 partir d'ARN extraits de neurones granulaires de cervelet de rat mis en culture selon les techniques connues de l'homme de métier. Avantageusement, des ARN extraits de neurones viables cultivés en présence de 25µM de potassium ont été comparés à des ARN extraits de neurones placés en conditions de toxicité par abaissement de la concentration de potassium à 5µM. Cette analyse 20 a été effectuée par criblage différentiel qualitatif selon la technique DATAS (décrise dans la demande n° WO99/46403).

Cette analyse a permis l'identification d'un fragment d'ADNc dérivé de l'ARNm d'une histone déacétylase, démontrant l'implication de cette enzyme dans le 25 développement des processus d'excitotoxicité et de mort neuronale. Plus particulièrement, la présente demande démontre l'existence d'une modification de l'épissage de l'histone déacétylase au cours de phénomènes d'excitotoxicité. Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence une altération de la séquence codante de cette enzyme dans les cerveaux engagés dans le 30 phénomène d'excitotoxicité lors de l'apparition des symptômes de l'ALS. Cette altération suggère une augmentation de l'activité de l'enzyme correspondante et donc une hypo-acétylation des histones et autres cibles nucléaires.

Le niveau d'acétylation de ces cibles régule l'activité transcriptionnelle et l'épissage des pré-mRNA. Le niveau d'acétylation des histones et autres facteurs nucléaires est régulé par la balance qui existe entre deux activités enzymatiques : l'activité histone acétyltransférase et l'activité histone déacétylase.

Il a été montré dans le cas de maladies liées à des agrégations de protéines modifiées par adjonctions de répétition de glutamine (la huntingtin dans la chorée de Huntington, le récepteur aux androgènes dans le cas de certaines atrophies musculaires spinales ou bulbaires) que les histones acétyltransférases sont séquestrées dans les agrégats protéiques. La demande WO01/17514 propose des compositions complexes comprenant un agent inducteur de l'expression de gènes et un modulateur de l'acétylation des histones, pour contrôler l'expression de gènes régulés par une phosphorylation. Ces compositions sont basées sur une action non-spécifique, au niveau de la chromatine, et ne suggèrent aucune implication des histones déacétylases dans les mécanismes de la neurotoxicité, ni de stratégie de régulation de ces enzymes pour le traitement de telles conditions pathologiques. La demande WO00/71703 porte sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens spécifiques d'histones déacétylases pour le traitement de cancers.

De manière surprenante, l'invention démontre pour la première fois l'existence d'un mécanisme moléculaire de dérégulation génétique conduisant à une excitotoxicité par baisse de l'acétylation des histones et autres facteurs nucléaires impliqués dans la régulation de l'expression génétique.

La présente invention fournit ainsi une nouvelle cible moléculaire pour le développement d'approches thérapeutiques et diagnostiques de pathologies liées à l'excitotoxicité. Ces stratégies sont basées sur une modulation de l'activité d'acétylation des histones, plus particulièrement sur une augmentation du niveau d'acétylation des histones. Cette modulation peut être exercée de

différentes manières, préférentiellement par l'utilisation d'inhibiteurs d'histones déacétylases. Ces stratégies thérapeutiques permettent d'améliorer la viabilité neuronale lors des phénomènes d'excitotoxicité impliqués dans différentes pathologies du système nerveux, notamment la maladie d'Alzheimer, la sclérose en plaque et la Sclérose Amyotrophique Latérale (SLA).

5 Un objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur d'histone déactétylase pour la préparation d'une composition destinée au traitement des maladies neurodégénératives, notamment en phase précoce, plus 10 préférentiellement pour réduire l'excitotoxicité neuronale associée aux maladies neurodégénératives, notamment en phase précoce.

15 Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de traitement d'une pathologie associée à un stress neuronal, notamment à une excitotoxicité, comprenant l'administration à un sujet d'un inhibiteur d'histone déacétylase.

Au sens de l'invention, on entend plus préférentiellement par pathologie 20 associée à une excitotoxicité, des maladies neurogénératives choisies parmi l'ALS, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaque et l'ischémie cérébrale. L'invention est également applicable au traitement de l'excitotoxicité neuronale survenant dans d'autres pathologies, notamment en phase précoce.

25 Dans le contexte de l'invention, le terme « traitement » désigne le traitement préventif, curatif, palliatif, ainsi que la prise en charge des patients (réduction de la souffrance, amélioration de la durée de vie, ralentissement de la progression de la maladie, amélioration de la viabilité de neurones placés en conditions d'excitotoxicité, etc.). Le traitement peut en outre être réalisé en combinaison avec d'autres agents ou traitements, notamment adressant les événements 30 tardifs de la pathologie, tels que des inhibiteurs de caspases ou autres composés actifs.

Le terme « inhibiteur » désigne tout composé ou traitement capable d'inhiber ou de réduire l'expression ou l'activité d'une histone déacétylase. L'inhibiteur est préférentiellement sélectif, c'est-à-dire actif essentiellement sur une histone déacétylase, sans action substantielle directe sur une autre enzyme. A titre 5 particulier, l'inhibiteur d'histone déacétylase est essentiellement dépourvu d'effet inhibiteur direct sur une histone acétyltransférase.

Différentes histones déacétylases ont été identifiées, clonées et caractérisées. On peut citer notamment l'histone déacétylase-1 (HDAC1), l'histone 10 déacétylase-2 (HDAC2) et l'histone déacétylase-3 (HDAC3), notamment humaines. Les séquences nucléiques codant ces enzymes et les séquences en acides aminés correspondantes sont décrites dans l'art antérieur, par exemple dans les banques de données Genbank sous les références NM_004964 (hHDAC1) ; NM_001527 (hHDAC2) ; NM_003883 (hHDAC3) ; AF006603 15 (mHDAC2). Ces séquences sont également accessibles d'autres sources publiques. Il est entendu que l'invention s'adresse également aux variants naturels et/ou homologues de ces séquences spécifiques.

Dans le cadre de la présente invention, on utilise préférentiellement un inhibiteur 20 d'histone déacétylase humaine, notamment d'hHDCA1, hHDCA2 et/ou hHDCA3, plus préférentiellement un composé inhibiteur.

Le composé utilisé peut être tout composé capable d'inhiber l'expression de l'histone déacétylase, c'est-à-dire en particulier tout composé inhibant la 25 transcription du gène, la maturation des ARNs, la traduction de l'ARN, la modification post-traductionnelle de la protéine, la liaison de la protéine sur une cible moléculaire, etc.

Le composé peut être de nature et d'origine variées, telles que notamment 30 d'origine naturelle (par exemple d'origine végétale, bactérienne, virale, animale ou eucaryote) ou synthétique (notamment une molécule organique ou inorganique, synthétique ou semi-synthétique). Il peut s'agir par exemple d'un

acide nucléique, un polypeptide (ou une protéine ou un peptide), un lipide, un composé chimique, etc.

Dans une première variante de réalisation, l'inhibiteur est un acide nucléique
5 anti-sens, capable d'inhiber la transcription du gène de l'histone déacétylase ou la traduction du messager correspondant. L'acide nucléique anti-sens peut comprendre tout ou partie de la séquence du gène de l'histone déacétylase, du messager de l'histone déacétylase, ou d'une séquence complémentaire à celles-ci. L'antisens peut être un ADN, un ARN, un ribozyme, etc. Il peut être
10 simple-brin ou double-brin. Il peut également s'agir d'un ARN codé par un gène antisens. Dans le cadre de l'utilisation d'un acide nucléique antisens comprenant une partie de la séquence du gène ou du messager considéré, on utilise préférentiellement une partie comprenant au moins 10 bases consécutives de la séquence, plus préférentiellement au moins 15, afin
15 de s'assurer une spécificité d'hybridation. S'agissant d'un oligonucléotide antisens, il comprend typiquement moins de 100 bases, par exemple de l'ordre de 10 à 50 bases. Cet oligonucléotide peut être modifié pour améliorer sa stabilité, sa résistance aux nucléases, sa pénétration cellulaire, etc. Une complémentarité parfaite entre la séquence de l'antisens et celle du gène ou messager cible n'est
20 pas indispensable, mais elle est généralement préférée.

Selon une autre variante de réalisation, le composé inhibiteur est un polypeptide. Il peut s'agir par exemple d'un peptide comprenant une région de la séquence d'une histone déacétylase, et capable d'antagoniser son activité. Un
25 peptide comprend avantageusement de 5 à 50 acides aminés consécutifs de la séquence primaire de la déacétylase considérée, typiquement de 7 à 40. Le polypeptide peut également être un anticorps anti-histone déacétylase, ou un fragment ou dérivé d'un tel anticorps, par exemple un fragment Fab, une région CDR, ou, plus préférentiellement, un anticorps simple-chaîne (e.g., ScFv). Les
30 anticorps simple-chaîne sont particulièrement avantageux dans la mesure où ils peuvent agir de manière spécifique et intracellulaire pour moduler l'activité d'une protéine cible. De tels anticorps ou fragments ou dérivés peuvent être produits

par des techniques conventionnelles, comprenant l'immunisation d'un animal et la récupération de son sérum (polyclonal) ou de cellules spléniques (de manière à produire des hybridomes par fusion avec des lignées cellulaires appropriées).

5 Des méthodes de production d'anticorps polyclonaux à partir d'espèces variées sont décrites dans l'art antérieur. Typiquement, l'antigène est combiné avec un adjuvant (e. g., Freund's adjuvant) et administré à un animal, typiquement par injection sous-cutanée. Des injections répétées peuvent être réalisées. Les échantillons sanguins sont collectés et l'immunoglobuline ou le sérum sont 10 séparés. Les méthodes classiques de production d'anticorps monoclonaux comprennent l'immunisation d'un animal avec un antigène, suivie de la récupération des cellules spléniques qui sont ensuite fusionnées avec des cellules immortalisées, telles que des cellules de myélome. Les hybridomes résultant produisent des anticorps monoclonaux et peuvent être sélectionnés 15 par dilutions limites de manière à isoler les clones individuels. Les fragments Fab ou F(ab')2 peuvent être produits par digestion à l'aide d'une protéase selon les techniques conventionnelles.

Selon une autre variante de réalisation, le composé est un composé chimique, 20 d'origine naturelle ou synthétique, notamment une molécule organique ou inorganique, capable de moduler l'expression ou l'activité de l'histone déacétylase. De tels composés peuvent être produits et/ou sélectionnés selon différents tests décrits ci-après. A titre d'exemple préféré, on peut citer de manière non limitative la trichostatin A, trapoxine, apicidine, pyroxamide, 25 valproate, benzamide, différents butyrates, tels que le butyrate de sodium ou le phénylbutyrate, des dérivés butyrates tels que décrits dans la demande WO98/00127, ou des analogues ou similaires. La trichostatin A est un exemple préféré.

30 Un objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé inhibiteur d'une histone déacétylase humaine, notamment d'un inhibiteur sélectif, pour la préparation d'une composition destinée à réduire l'excitotoxicité neuronale.

Un objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un composé inhibiteur de l'histone déacétylase 2 humaine, notamment d'un inhibiteur sélectif, pour la préparation d'une composition destinée à réduire l'excitotoxicité neuronale, notamment pour le traitement de l'ALS.

5

Un objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un inhibiteur d'une histone déacétylase humaine, notamment d'un inhibiteur sélectif, pour la préparation d'une composition destinée au traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de l'ALS.

10 Un autre objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation de la trichostatin A pour la préparation d'une composition destinée à réduire l'excitotoxicité neuronale et/ou pour la préparation d'une composition destinée au traitement de l'ALS.

15 Un autre objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation de la trichostatin A pour la préparation d'une composition destinée à inhiber l'activité de l'histone déacétylase 2 chez les patients atteints d'ALS.

20 L'invention concerne également des méthodes de traitement de l'ALS comprenant l'administration à un sujet d'une quantité efficace d'un composé inhibiteur de l'expression ou de l'activité d'une histone déacétylase, notamment de l'histone déacétylase 2, de préférence humaines.

De préférence, l'invention est utilisée pour le traitement en phase précoce des maladies neurodégénératives.

25

L'administration peut être réalisée par toute méthode connue de l'homme du métier, de préférence par injection, typiquement par voie intra-péritonéale, intra-cérébrale, intra-veineuse, intra-artérielle ou intra-musculaire. Ces doses injectées peuvent être adaptées par l'homme de l'art. Typiquement, de 0,01 mg à 100 mg / kg environ sont injectés, pour des composés inhibiteurs de nature chimique. Pour des composés nucléiques, les doses peuvent varier par exemple entre 0,01 mg et 100 mg par dose. Il est entendu que des injections répétées

peuvent être réalisées, éventuellement en combinaison avec d'autres agents actifs ou tout véhicule acceptable sur le plan pharmaceutique (e.g., tampons, solutions saline, isotonique, en présence d'agents stabilisants, etc.).

5 L'invention est utilisable chez les mammifères, notamment chez l'être humain.

L'invention montre notamment l'existence d'événements d'épissage qui affectent la région codante de l'histone déacétylase 2 (mHDA2, référence Genbank : AF006603), plus particulièrement une région recouvrant les 10 nucléotides 2934 à 3243. Cet épissage détecté préférentiellement dans les conditions de viabilité neuronale (25 μ M de potassium) inactive l'enzyme et aboutit à une augmentation de l'acétylation des histones et autres acteurs de l'expression génétique dans les neurones viables. Réciproquement, il est mis en évidence qu'une diminution de l'acétylation des mêmes acteurs nucléaires est 15 associée à la mort neuronale en présence de 5 μ M de potassium. La présente invention ouvre donc une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur l'utilisation d'inhibiteurs d'histone déacétylase afin de restaurer la viabilité neuronale lors d'efflux de potassium et notamment lors des phénomènes d'excitotoxicité et plus particulièrement lors de pathologies comme l'ALS. La présente invention 20 propose, pour la première fois, l'histone déacétylase 2 comme cible thérapeutique pour le traitement des événements moléculaires associés à l'excitotoxicité. Selon des modes de mise en œuvre particuliers, l'invention peut être utilisée pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce des maladies neurodégénératives. Elle est applicable notamment au traitement 25 de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, ou de l'ischémie cérébrale.

La présente invention fournit également une nouvelle cible pour l'identification, la validation, la sélection ou l'optimisation de composés actifs. L'invention 30 permet en effet de sélectionner des composés ayant des propriétés thérapeutiques ou biologiques avantageuses, sur la base de leur capacité à moduler l'expression ou l'activité d'histone déacétylase. Ces tests peuvent être

réalisés en système cellulaire, animal, ou acellulaire (e.g., sur des protéines, polypeptides ou acides nucléiques isolés, ou sur des système d'expression *in vitro*), et être basés sur la mesure d'une interaction (e.g., tests de liaison, déplacement, compétition, etc.) ou d'une fonction (activité, transcription, etc.).

5

Un autre objet particulier de l'invention concerne une méthode de sélection, identification ou caractérisation de composés actifs, notamment sur les pathologies associées à l'excitotoxicité ou au stress neuronal, comprenant la mise en contact d'un composé test avec une cellule exprimant une histone déacétylase ou un fragment ou variant fonctionnel de celle-ci, et la détermination de la capacité du composé à inhiber l'expression ou l'activité de cette protéine.

10 Les méthodes peuvent être mises en œuvre avec différentes populations cellulaires, telles que des cellules primaires ou des lignées de cellules d'origine mammifère (humaine, murine, etc.). On utilise avantageusement des cellules qui n'expriment pas naturellement l'histone déacétylase considérée, transfectées avec un acide nucléique codant l'enzyme souhaitée. De cette manière, la sélectivité de la méthode est augmentée. On peut également utiliser des cellules 15 eucaryotes inférieures (levure, etc.) ou des cellules procaryotes. On peut également utiliser des animaux non-humains transgéniques.

20 L'effet inhibiteur peut être mesuré de différentes façons, comme notamment par dosage des ARN, dosage de la protéine, mesure d'une activité, etc. Les sondages peuvent être effectués par toute technique immuno-enzymatique 25 classique (RIA, ELISA, EIA, etc.) ou par des techniques d'hybridation avec des sondes marquées, sur puce, amplification avec des amorces spécifiques, etc.

Les méthodes de sélection peuvent également être réalisées en système 30 acellulaire, par mesure de la capacité de composés tests à lier l'histone déacétylase ou un variant ou fragment de celle-ci. A cet égard, un autre objet particulier de l'invention concerne une méthode de sélection, identification ou

caractérisation de composés actifs, notamment sur les pathologies associées à l'excitotoxicité ou au stress neuronal, comprenant la mise en contact d'un composé test avec une histone déacétylase ou un variant ou fragment de celle-ci, et la détermination de la capacité du composé test à lier ladite histone 5 déacétylase, fragment ou variant. L'histone déacétylase, fragment ou variant peut être utilisée sous forme isolée et purifiée, soluble ou attachée à un support (e.g., bille, colonne, etc.), ou incorporé à une membrane ou une vésicule. La liaison du composé test et de l'histone peut être déterminée par toute technique connue, notamment par déplacement d'un ligand de référence marqué, par 10 migration sur gel, électrophorèse, etc.

Le terme « variant » inclut des polypeptides comprenant une ou plusieurs mutations, substitutions, délétions et/ou additions d'un ou de plusieurs résidus d'acides aminés et présentant substantiellement la même spécificité antigénique 15 ou activité, et notamment conservant la capacité à déacétyler une histone. Des exemples typiques de dérivés incluent des variations de séquence dues au polymorphisme de l'histone déacétylase, à l'épissage, etc. Des dérivés particulièrement préférés comprennent au plus 5 résidus d'acides aminés distincts de ceux présents dans la séquence sauvage. Le terme « fragment » 20 désigne tout polypeptide comprenant de 5 à 100 résidus consécutifs de la séquence en acides aminés de l'histone déacétylase, de préférence de 10 à 100. Les fragments comportent avantageusement un site actif de l'enzyme.

Les composés tests peuvent être de nature et d'origine variées, telles que des 25 composés naturels ou synthétiques, des lipides, des acides nucléiques, des polypeptides, des molécules chimiques, etc. Il peut s'agir de composés isolés ou sous forme de mélange, de banques combinatoires, etc. Dans les méthodes de l'invention, il est possible de tester en parallèle plusieurs composés tests, par exemple dans des dispositifs adaptés tels que plaque multipuits, boîte, etc.

30

Un autre objet de l'invention concerne tout variant d'épissage d'une histone déacétylase ainsi que tout acide nucléique codant un tel polypeptide, les

vecteurs le contenant, cellules recombinantes, et utilisations. Les vecteurs peuvent être des plasmides, phages, cosmides, virus, chromosomes artificiels, etc. Des vecteurs préférés sont par exemple des vecteurs plasmidiques, comme ceux dérivés de plasmides commerciaux (pUC, pcDNA, pBR, etc.). De tels vecteurs comportent avantageusement un gène de sélection et/ou une origine de réplication et/ou un promoteur transcriptionnel. D'autres vecteurs particuliers sont par exemple des virus ou des phages, notamment des virus recombinants défectifs pour la réplication, tels que des virus dérivés de rétrovirus, adénovirus, AAV, herpès-virus, baculovirus, etc. Les vecteurs peuvent être utilisés dans tout hôte compétent, comme par exemple des cellules procaryotes ou eucaryotes. Il peut s'agir de bactéries (par exemple *E. coli*), levures (par exemple *Saccharomyces* ou *Kluyveromyces*), cellules végétales, cellules d'insectes, cellules de mammifères, notamment humaines, etc. Il peut s'agir de lignées, cellules primaires, cultures mixtes, etc.

La présente invention est également utilisable pour le diagnostic de situations d'excitotoxicité, notamment en phases précoce. Elle est notamment utilisable pour détecter la présence, la prédisposition ou le développement d'une situation d'excitotoxicité chez un sujet, notamment d'une pathologie associée à une telle situation, telle que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la sclérose en plaques, l'ALS ou l'ischémie cérébrale. Elle est particulièrement adaptée à la détection à un stade précoce de la sclérose en plaques ou de l'ALS.

Un autre aspect de la présente demande concerne donc des méthodes et outils pour détecter la présence d'une histone déacétylase (ou d'un variant d'épissage ou autre altération génétique) dans des échantillons biologiques, ou pour la doser ou déterminer ses quantités relatives.

Un objet particulier de l'invention concerne une méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la mesure *in vitro* ou *ex vivo* de l'expression d'une (ou de plusieurs) histones

déacétylases, notamment de l'histone déacétylase 2, dans un échantillon provenant du sujet.

Un autre objet particulier concerne une méthode de détection d'une situation 5 d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la détection de la présence (ou de l'absence) d'une forme mutée d'une (ou de plusieurs) histones déacétylases, notamment de l'histone déacétylase 2, ou de l'ARN correspondant, dans un échantillon provenant du sujet.

10 Des outils adaptés à la mesure ou à la détection d'une protéine, d'un ARN ou d'une expression comprennent notamment des sondes ou amorces nucléiques, des anticorps ou autres ligands spécifiques, des kits, supports, puces, etc. Les méthodes de détection peuvent inclure les méthodes d'hybridation, de PCR, de chromatographie, d'immunologie, etc. Ces méthodes sont particulièrement 15 adaptées à la détection, la caractérisation, le suivi de la progression ou de l'efficacité d'un traitement de pathologies telles que mentionnées ci-dessus, ou à la détermination d'une prédisposition.

La méthode peut être mise en œuvre à partir de différents échantillons 20 biologiques, tels que sang, plasma, urine, sérum, salive, biopsies ou cultures cellulaires, etc. Il s'agit de préférence d'un échantillon comprenant des cellules nerveuses ou musculaires. Selon la technique utilisée, l'échantillon peut être traité préalablement, par exemple pour rendre les acides nucléiques accessibles à une réaction d'hybridation et/ou d'amplification, et/ou pour rendre les protéines 25 accessibles à une réaction immunologique ou enzymatique.

Dans un mode particulier de mise en œuvre, on mesure l'expression, on détecte ou on dose, dans l'échantillon, la présence ou la quantité d'ARNm codant une histone déacétylase. Plusieurs histones déacétylases peuvent être détectées ou 30 dosées en parallèle.

Cette mesure, détection ou ce dosage peuvent être effectués par hybridation de l'échantillon avec une sonde nucléique spécifique de l'ARN considéré, notamment une sonde comprenant tout ou partie d'une séquence de l'ARN messager de l'histone déacétylase ou d'une séquence complémentaire ou dérivée. Dans un mode particulier, la sonde est simple-brin et/ou est marquée, pour faciliter la détection du produit d'hybridation. Le marquage peut être radioactif, fluorescent, luminescent, etc. La sonde peut être immobilisée sur un support.

5

10 Un objet particulier de l'invention réside dans l'utilisation d'un acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée du gène ou de l'ARN messager d'une histone déacétylase pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic, de détection, de dépistage ou de caractérisation d'une situation de stress neuronal et plus particulièrement la situation d'excitotoxicité, notamment d'une méthode de diagnostic, de détection, de dépistage ou de caractérisation de pathologies neurodégénératives ayant une composante ou un stade lié au phénomène d'excitotoxicité ou de stress neuronal, notamment d'une séquence spécifique, complémentaire ou dérivée de cette séquence.

15

20 Comme indiqué ci-dessus, la présente demande démontre l'existence d'une forme non épissée dans certains tissus engagés dans des processus de neurotoxicité, et l'invention permet une détection ou un dosage relatif de la forme épissée et de la forme non épissée dans l'échantillon. L'apparition, la présence ou l'augmentation de l'espèce non-épissée est corrélée au développement de la situation d'excitotoxicité. Dans une variante particulière, la méthode de l'invention prévoit donc une analyse de la présence de la forme épissée et/ou de la forme non épissée de l'ARN codant l'histone déacétylase. Cette détection peut être réalisée par exemple en utilisant une sonde nucléique spécifique de la séquence résultant de la jonction entre les régions non déletées (i.e., non-épissées) de l'ARN. L'évolution de rapport entre la forme épissée et la forme non épissée peut être suivie, comme un indicateur de la progression de la pathologie (ou de l'efficacité d'un traitement.

25

30

La mesure, détection ou le dosage peuvent également être effectués par amplification sélective des acides nucléiques de l'échantillon avec une amorce nucléique (ou un couple d'amorces) spécifique de l'ARN considéré. Dans un 5 mode particulier, l'amorce (ou l'une des amorces du couple) est spécifique de la séquence résultant de la jonction entre les régions non délétées (i.e., non-épissées) de l'ARN. L'amplification peut être effectuée par exemple par PCR. Le produit d'amplification peut être détecté ou dosé par toute technique connue. Une telle amorce (ou couple d'amorce) constitue un autre objet de la présente 10 demande.

Dans un autre mode particulier de mise en œuvre, on détecte ou on dose, dans l'échantillon, la présence ou la quantité d'histone déacétylase. Cette détection peut être réalisée en utilisant un anticorps spécifique, ou tout autre ligand 15 spécifique.

Un autre objet de l'invention concerne un (produit comprenant un) support sur lequel un ou plusieurs acides nucléiques (y compris un vecteur, une sonde, une amorce, un oligonucléotide, un antisens), polypeptides (y compris un anticorps) 20 ou cellules tels que définis ci-avant sont immobilisés. Le support peut être solide, plan ou non, régulier ou non, comme par exemple du nylon, verre, plastique, etc., ou tout autre matériau compatible. Les polypeptides ou acides nucléiques sont préférentiellement immobilisés par une extrémité, dans des conditions laissant la molécule accessible pour une réaction d'interaction avec 25 un ligand spécifique, tel qu'un anticorps ou une sonde. Les polypeptides ou acides nucléiques peuvent être arrangés de manière précise sur le support, et déposés en plusieurs exemplaires.

L'invention est également utilisable pour la caractérisation de tissu et de la 30 situation ischémique. Cette utilisation est également basée sur la détection ou le dosage d'une histone déacétylase ou d'une forme altérée dans le tissu.

D'autres aspects et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

5

EXEMPLES

Exemple 1 : Identification de l'histone déacétylase 2 comme cible moléculaire de l'excitotoxicité

10

L'analyse qualitative différentielle a été effectuée à partir d'ARN poly adénylés (poly A+) extraits d'échantillons de cerveaux d'animaux correspondant aux différents stades, sans isolement préalable des neurones afin de prendre en compte un maximum d'événements d'épissages alternatifs liés au développement de la pathologie.

15

Les ARN poly A+ sont préparés selon des techniques connues de l'homme de métier. Il peut s'agir en particulier d'un traitement au moyen d'agents chaotropiques tels que le thiocyanate de guanidium suivi d'une extraction des ARN totaux au moyen de solvants (phénol, chloroforme par exemple). De telles méthodes sont bien connues de l'homme du métier (voir Maniatis et al., Chomczynsli et al., Anal. Biochem. 162 (1987) 156), et peuvent être aisément pratiquées en utilisant des kits disponibles dans le commerce. A partir de ces ARN totaux, les ARN poly A+ sont préparés selon des méthodes classiques connues de l'homme de métier et proposées par des kits commerciaux.

20

Ces ARN poly A+ servent de matrice à des réactions de transcription inverse à l'aide de reverse transcriptase. Avantageusement sont utilisées des reverse transcriptases dépourvues d'activité RNase H qui permettent d'obtenir des premiers brins d'ADN complémentaire de tailles supérieures à ceux obtenus avec des reverse transcriptases classiques. De telles préparations de reverse transcriptases sans activité RNase H sont disponibles commercialement.

25

Pour chaque point de la cinétique de développement de la pathologie (30 jours, 60 jours et 90 jours) les ARN poly A+ ainsi que les ADNc simple brins sont

préparés à partir des animaux transgéniques (T) et des animaux contrôles syngéniques (C).

Conformément à la technique DATAS, pour chaque point de la cinétique sont réalisées des hybridations d'ARNm (C) avec des ADNc (T) et des hybridations 5 réiproques d'ARNm (T) avec des ADNc (C).

Ces hétéroduplex ARNm/ADNc sont ensuite purifiés selon les protocoles de la technique DATAS.

Les séquences d'ARN non appariées avec un ADN complémentaire sont libérées de ces hétéroduplex sous l'action de la RNase H, cette enzyme

10 dégradant les séquences d'ARN appariées. Ces séquences non appariées représentent les différences qualitatives qui existent entre des ARN par ailleurs homologues entre eux. Ces différences qualitatives peuvent être localisées n'importe où sur la séquence des ARN, aussi bien en 5', 3' ou à l'intérieur de la 15 séquence et notamment dans la séquence codante. Selon leur localisation, ces séquences peuvent être non seulement des modifications d'épissage mais également des conséquences de translocations ou de délétions.

Les séquences d'ARN représentant les différences qualitatives sont ensuite clonées selon les techniques connues de l'homme de métier et notamment 20 celles décrites dans le brevet de la technique DATAS.

25 Ces séquences sont regroupées au sein de banques de cDNA qui constituent des banques qualitatives différentielles. Une de ces banques contient les exons et les introns spécifiques de la situation saine ; les autres banques contiennent les événements d'épissage caractéristiques des conditions pathologiques.

L'expression différentielle des clones a été vérifiée par hybridation avec des

25 sondes obtenues par reverse-transcription à partir d'ARN messagers extraits des différentes situations étudiées. Les clones hybridant de façon différentielle ont été retenus pour analyse ultérieure. Les séquences identifiées par DATAS correspondent à des introns et/ou à des exons exprimées de façon différentielle par épissage entre les situations pathologiques et la situation saine. Ces 30 événements d'épissage peuvent être spécifiques d'une étape donnée du développement de la pathologie ou caractéristiques de l'état sain.

La comparaison de ces séquences avec les banques de données permet de classifier les informations obtenues et de proposer une sélection raisonnée des séquences selon leur intérêt diagnostique ou thérapeutique.

5 Les résultats obtenus montrent l'existence d'événements d'épissage qui affectent la région codante de l'histone déacétylase 2 (mHDA2, référence Genbank : AF006603), plus particulièrement une région recouvrant les nucléotides 2934 à 3243. Cet épissage détecté préférentiellement dans les conditions de viabilité neuronale (25µM de potassium) inactive l'enzyme et 10 aboutit à une augmentation de l'acétylation des histones et autres acteurs de l'expression génétique dans les neurones viables. Réciproquement, il est mis en évidence qu'une diminution de l'acétylation des mêmes acteurs nucléaires est associée à la mort neuronale en présence de 5µM de potassium.

15 Exemple 2 : Inhibition de l'excitotoxicité par des inhibiteurs d'histone déacétylase

Pour cet exemple, des neurones granulaires du cervelet de rat sont mis en culture selon les techniques connues de l'homme de métier. L'excitotoxicité est 20 induite sur ces cellules par deux types de traitement : l'administration conjointe de 100µM de NMDA (N-Methyl-D-apartic acid) et de 10µM de sérine d'une part, l'administration de 50µM de kainate d'autre part. Dans les conditions expérimentales retenues, 30 à 40% de toxicité est observée et mesurée par des tests MTT connus de l'homme de l'art.

25 Une inhibition de l'excitotoxicité peut être mise en évidence en présence d'inhibiteurs d'histone déacétylase, notamment de trichostatin A. La présente invention documente donc l'implication de l'histone déacétylase 2 dans les mécanismes d'excitotoxicité, notamment dans un modèle d'ALS, et aussi la 30 capacité d'inhibiteurs de cette enzyme à préserver la viabilité neuronale lors de stress liés à l'excitotoxicité.

D'autres aspects et applications de l'invention résident dans :

- l'utilisation de tout fragment d'acide nucléique y compris des ARN anti-sens dans le but d'inhiber l'expression de l'histone déacétylase 2 chez les patients atteints de telles pathologies,
- l'utilisation de tout composé chimique, la trichostatin A, ou de toute composition pharmaceutique la contenant, dans le but d'inhiber l'activité de l'histone déacétylase 2 chez les patients atteints de telles pathologies.

REVENDICATIONS

1. Méthode de détection d'une situation d'excitotoxicité ou de stress neuronal chez un sujet, comprenant la mesure *in vitro* de l'expression d'une histone déacétylase, notamment de l'histone déacétylase 2, dans un échantillon provenant du sujet ou la détection de la présence d'une forme mutée d'une histone déacétylase, notamment de l'histone déacétylase 2, ou de l'ARN correspondant, dans un échantillon provenant du sujet.
- 10 2. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la mesure de l'expression est effectuée par hybridation de l'échantillon avec une sonde nucléique spécifique de l'ARN de l'histone déacétylase considérée.
- 15 3. Méthode selon la revendication 2, caractérisée en ce que la sonde nucléique comprend tout ou partie d'une séquence de l'ARN messager de l'histone déacétylase ou d'une séquence complémentaire ou dérivée de celle-ci.
- 20 4. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que la mesure de l'expression est effectuée par amplification sélective des acides nucléiques de l'échantillon avec une amorce nucléique (ou un couple d'amorces) spécifique de l'ARN considéré.
- 25 5. Méthode selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que l'échantillon comprend des cellules nerveuses ou musculaires.
6. Méthode selon l'une des revendications 1 à 5, pour le diagnostic ou la détection de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques, de l'ALS ou de l'ischémie cérébrale.
- 30 7. Méthode selon la revendication 6, pour la détection à un stade précoce de la sclérose en plaques.

8. Utilisation d'un acide nucléique comprenant tout ou partie d'une séquence dérivée du gène ou de l'ARN messager de l'histone déacétylase 2 pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic ou de détection d'une situation de stress neuronal et plus particulièrement la situation d'excitotoxicité.

5

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que l'acide nucléique comprend tout ou partie de l'histone déacétylase 2, ou de la séquence résultant de la jonction entre les régions non déletées, ou une séquence complémentaire de celles-ci.

10

10. Utilisation d'un composé inhibiteur d'histone déacétylase pour la préparation d'une composition destinée au traitement des maladies neurodégénératives associées à une excitotoxicité.

15

11. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le composé est acide nucléique anti-sens, capable d'inhiber la transcription du gène de l'histone déacétylase ou la traduction du messager correspondant.

20

12. Utilisation selon la revendication 10, caractérisée en ce que le composé est un composé chimique, d'origine naturelle ou synthétique.

13. Utilisation selon la revendication 12, caractérisée en ce que le composé est la trichostatinA.

25

14. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 13, pour inhiber ou réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce des maladies neurodégénératives.

30

15. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 14, pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, de la maladie de Parkinson, de la sclérose en plaques ou de l'ischémie cérébrale.

16. Utilisation selon l'une des revendications 10 à 14, pour le traitement de l'ALS, notamment pour réduire l'excitotoxicité neuronale en phase précoce de l'ALS.

5 17. Méthode de sélection, identification ou caractérisation de composés actifs, notamment sur les pathologies associées à l'excitotoxicité ou au stress neuronal, comprenant la mise en contact d'un composé test avec une cellule exprimant une histone déacétylase ou un fragment ou variant fonctionnel de celle-ci, et la détermination de la capacité du composé à inhiber l'expression ou 10 l'activité de cette protéine.

18. Méthode de sélection, identification ou caractérisation de composés actifs, notamment sur les pathologies associées à l'excitotoxicité ou au stress neuronal, comprenant la mise en contact d'un composé test avec une histone 15 déacétylase ou un variant ou fragment de celle-ci, et la détermination de la capacité du composé test à lier ladite histone déacétylase, fragment ou variant.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/FR 03/00940A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68 A61K31/7088 A61K31/00 A61P25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| A | AIT-IKHLEF A ET AL: "Identification of splice variants in Amyotrophic Lateral Sclerosis using a new technology: DATAS" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, US, vol. 27, no. 2, 2001, page 1649 XP002201672 ISSN: 0190-5295 the whole document | 1-7 |
| A | WO 02 00872 A (EXONHIT THERAPEUTICS SA ;AIT-IKHLEF ALI (FR); RESINK ANNELIES (FR)) 3 January 2002 (2002-01-03) the whole document | 1-7 |
| A | WO 00 71703 A (METHYLGENE INC) 30 November 2000 (2000-11-30) claims 1-11,16-35 | 11,12, 17,18 |

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *A* document member of the same patent family

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the International search report |
| 22 August 2003 | 28/08/2003 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Osborne, H |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interns Application No
PCT/FR 03/00940

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------|
| A | SALMINEN A ET AL: "NEURONAL APOPTOSIS INDUCED BY HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS" MOLECULAR BRAIN RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE BV, AMSTERDAM, NL, vol. 61, 1998, pages 203-206, XP002935360 ISSN: 0169-328X | |
| X | WO 01 17514 A (SALK INST OF BIOLOG STUDIES ;MONTMINY MARC R (US)) 15 March 2001 (2001-03-15) claims 1-3,28-38 | 10,13-16 |
| P,X | WO 02 26703 A (ROMERO MARTIN MARIA ROSARIO ;FINN PAUL W (GB); HARRIS C JOHN (GB)); 4 April 2002 (2002-04-04) page 74, line 19 - line 21 | 10,13-16 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No
PCT/FR 03/00940

| Patent document cited in search report | | Publication date | | Patent family member(s) | Publication date |
|--|---|------------------|----------------------------------|--|--|
| WO 0200872 | A | 03-01-2002 | FR AU WO | 2810995 A1 7069101 A 0200872 A2 | 04-01-2002 08-01-2002 03-01-2002 |
| WO 0071703 | A | 30-11-2000 | AU CA EP WO JP US | 6718200 A 2366408 A1 1173562 A2 0071703 A2 2003500052 T 2003078216 A1 | 12-12-2000 30-11-2000 23-01-2002 30-11-2000 07-01-2003 24-04-2003 |
| WO 0117514 | A | 15-03-2001 | AU WO | 7108400 A 0117514 A1 | 10-04-2001 15-03-2001 |
| WO 0226703 | A | 04-04-2002 | AU CA WO | 9013201 A 2423970 A1 0226703 A1 | 08-04-2002 04-04-2002 04-04-2002 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande n°
PCT/FR 03/00940A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12Q/68 A61K31/7088 A61K31/00 A61P25/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12Q A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, si si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERÉS COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-------------|---|-------------------------------|
| A | AIT-IKHLEF A ET AL: "Identification of splice variants in Amyotrophic Lateral Sclerosis using a new technology: DATAS" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, US, vol. 27, no. 2, 2001, page 1649 XP002201672 ISSN: 0190-5295 le document en entier | 1-7 |
| A | WO 02 00872 A (EXONHIT THERAPEUTICS SA ;AIT IKHLEF ALI (FR); RESINK ANNELIES (FR)) 3 janvier 2002 (2002-01-03) le document en entier | 1-7 |
| A | WO 00 71703 A (METHYLEGENE INC) 30 novembre 2000 (2000-11-30) revendications 1-11,16-35 | 11,12, 17,18 |

 Voir le suivi du cadre C pour la fin de la liste des documents Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date du dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date du dépôt international d'une autre classification (ou une autre spécification indiquée)
- *O* document référant à une invention orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document édité ou publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et traitant directement pas à l'égard de la technique pertinente, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventif par rapport au document considéré comme pertinent
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventif par rapport au document considéré comme pertinent, mais le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement échouée

22 août 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/08/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5618 Patentzaan 2
NL - 2280-HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx. 31 651 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Osborne, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/00940

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A | SALMINEN A ET AL: "NEURONAL APOPTOSIS INDUCED BY HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS" MOLECULAR BRAIN RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE BV, AMSTERDAM, NL, vol. 61, 1998, pages 203-206, XP002935360 ISSN: 0169-328X | |
| X | WO 01 17514 A (SALK INST OF BIOLOG STUDIES ; MONTMINY MARC R (US)) 15 mars 2001 (2001-03-15) revendications 1-3,28-38 | 10,13-16 |
| P,X | WO 02 26703 A (ROMERO MARTIN MARIA ROSARIO ; FINN PAUL W (GB); HARRIS C JOHN (GB)); 4 avril 2002 (2002-04-04) page 74, ligne 19 - ligne 21 | 10,13-16 |

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/00940

| Document brevet cité au rapport de recherche | | Date de publication | | Membre(s) de la famille de brevet(s) | Date de publication |
|---|---|------------------------|----------------------------------|--|--|
| WO 0200872 | A | 03-01-2002 | FR AU WO | 2810995 A1 7069101 A 0200872 A2 | 04-01-2002 08-01-2002 03-01-2002 |
| WO 0071703 | A | 30-11-2000 | AU CA EP WO JP US | 6718200 A 2366408 A1 1173562 A2 0071703 A2 2003500052 T 2003078216 A1 | 12-12-2000 30-11-2000 23-01-2002 30-11-2000 07-01-2003 24-04-2003 |
| WO 0117514 | A | 15-03-2001 | AU WO | 7108400 A 0117514 A1 | 10-04-2001 15-03-2001 |
| WO 0226703 | A | 04-04-2002 | AU CA WO | 9013201 A 2423970 A1 0226703 A1 | 08-04-2002 04-04-2002 04-04-2002 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)